



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/87, 5/10, C07K 14/78	A1	(11) 国際公開番号 WO96/17073 (43) 国際公開日 1996年6月6日 (06.06.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP95/02425 (22) 国際出願日 1995年11月29日 (29.11.95) (30) 優先権データ 特願平6/317721 1994年11月29日 (29.11.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社 (TAKARA SHUZO CO., LTD.) [JP/JP] 〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP) (72) 発明者：および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 橋野仁一 (HASHINO, Kimikazu) [JP/JP] 〒569 大阪府高槻市明野町27-3 Osaka, (JP) 松下秀之 (MATSUSHITA, Hideoyuki) [JP/JP] 〒525 滋賀県草津市西院川2丁目12-1 ハーモバレス草津401号 Shiga, (JP) 加藤郁之進 (KATO, Ikumoshin) [JP/JP] 〒611 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP)		(74) 代理人 弁理士 青山 茂, 外 (AOYAMA, Tamotzu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 I M P ビル 青山特許事務所 Osaka, (JP) (81) 指定国 AL, AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TO), ARIPO特許 (KE, LS, MW, SD, SZ, UG). 添付公開書類 国際調査報告
(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING TRANSFORMED CELL (54) 発明の名称 形質転換細胞の製造方法 (57) Abstract <p>A process for producing transformed cells by introducing foreign genes into target cells through piercing, which comprises the step of culturing the target cells having the foreign genes injected therein in the presence of a cell adhesion-active substance; and a kit for producing transformed cells suitable for use in the above method and containing as the essential ingredients the cells to be transformed with foreign genes by this method and a cell adhesion-active substance.</p>		

(57) 要約

穿孔法を用いて外来遺伝子を標的細胞に導入し、形質転換細胞を製造するに際し、標的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質の存在下で培養する工程を包含する外来遺伝子による形質転換細胞の製造方法、該方法によって製造される外来遺伝子による形質転換細胞および細胞接着活性物質を必須の構成成分とする該方法で使用するに適した形質転換細胞製造用キットを開示する。

情報としての用途のみ

P.C.T.に基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にP.C.T.加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	EE	エストニア	LR	リベリア	PR	プエルトリコ
AT	オーストリア	ES	スペイン	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	MC	モナコ	SI	スロベニア共和国
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SK	スロバキア共和国
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MA	マダガスカル	NZ	ニュージーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IT	イタリア	MN	モンゴル	TH	タイ
CC	中央アフリカ共和国	JP	日本	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	KE	ケニア	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CH	スイス	KR	韓国	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KZ	カザフスタン	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	LI	リヒテンシュタイン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国			NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国			NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
DE	ドイツ			PL	ポーランド		

明 細

形質転換細胞の製造方法

技術分野

本発明は、形質転換細胞の製造方法、さらに詳しくは、細胞工学、遺伝子工学、発生工学などの分野において標的細胞への外来遺伝子導入を効率良く行うことを可能にする方法に関する。

背景技術

標的細胞内への外来遺伝子導入方法には、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、リボソーム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法などが知られている。いずれの方法も操作法、効率、細胞に対するダメージなどの点で一長一短がある。中でもエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等の穿孔法は、特別な試薬を用いることなく細胞の取扱いが可能であり、導入効率も良好である。しかしながら、穿孔による細胞のダメージは免れない。

本発明の目的は、穿孔法により標的細胞内へ外来遺伝子を導入して形質転換細胞を製造する際の、導入効率を向上させる方法を提供することにある。さらに、該方法に用いるキットを提供することも目的とする。

発明の概要

本発明の第1の発明は形質転換細胞の製造方法に関する発明であって、穿孔法を用いて形質転換細胞を製造する方法において、穿孔法を用いて標的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質

の存在下で培養する工程を包含することを特徴とする。

本発明の第2の発明は、本発明の製造方法で製造される外来遺伝子による形質転換細胞に関する発明である。

また、本発明の第3の発明は、形質転換細胞製造用キットに関する発明であって、上記第1の発明の形質転換細胞の製造方法に使用するキットであって、細胞接着活性物質を含有することを特徴とする。

発明の詳細な説明

本発明の方法は、穿孔法を用いて標的細胞に外来遺伝子を導入した後に、細胞接着活性を有する物質の存在下この細胞を培養することを特徴とする。

本発明において穿孔法とは、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等であり、細胞壁の穿孔により、遺伝子を注入する方法である。エレクトロポレーション法とは、例えば、蛋白質、核酸、酵素、第31巻、第1591～1603頁（1986）に記載の方法であり、マイクロインジェクション法とは、例えば、セル(Cell)、第22巻、第479～488頁（1980）に記載の方法であり、パーティクルガン法とは、例えば、テクニック (Technique)、第3巻、第3～16頁（1991）に記載の方法であり、細胞に遺伝子を導入する方法として使用する公知の方法を包含する。

これらの穿孔法で使用される細胞としては、例えば、動物細胞を公知 [日本生化学会編：“新生化学実験講座18 細胞培養技術”、(第1版) (1990) 東京化学同人発行] の方法で調製すれば良く、また、培養動物細胞を使用しても良い。

細胞接着活性物質とは、細胞接着活性、すなわち標的細胞を細胞、あるいは組織内にある細胞間を満たす物質である細胞外マトリックス、またプラスチックやガラスなどの器質に接着させる活性を有する物質をいい、本

発明においては、標的細胞の形質転換に悪影響を及ぼさない限り、いずれの該活性を有する物質も使用できる。かかる活性とは、細胞をその形態を保持して、あるいは伸展、すなわち—またはそれ以上の方向に細胞が伸び、その形態が変化した状態で、例えば細胞接着活性物質を被覆した培養器具に固定する活性である。

細胞接着活性物質と標的細胞の結合は慣用の方法を使用して同様にアッセイすることができる。例えば、このような方法にはネイチャー(Nature)、352:438~441(1991年)に記載された方法が含まれる。簡単に言えば、細胞接着活性物質はプラスチック皿上を被覆しており、そしてアッセイすべき細胞集団は培地に重層して30分から2時間置く。このインキュベーション期間後に、接着していない細胞を回収し、計数しそして生存性についてアッセイする。細胞接着活性物質と接着した細胞もトリプシンまたは細胞解離緩衝液(例えば、Gibco)を使用して回収し、計数しそして生存性を試験する。次に、接着細胞の割合を計算しそしてウシ血清アルブミン(BSA)被覆プラスチック皿のような標準乃至標準対照と比較する。標的細胞とアッセイした細胞接着活性物質の実質的な接着によって、細胞接着活性物質/細胞の組合せを決定できる。または細胞伸展活性は、上記操作中、接着した細胞をトリプシンまたは細胞解離緩衝液を用いて解離させる前にその形態変化を顕微鏡下で観察することによって測定することができる。

細胞接着活性物質としては、例えば、細胞接着活性ポリペプチドまたは該ポリペプチドの機能的同等物や細胞接着合成ポリマーが挙げられる。

本発明に使用する細胞接着活性を有するポリペプチドとしては、例えば、インベイン、ポリリジン等の細胞外マトリックス由来以外の細胞接着活性ポリペプチド、例えば、特開平2-311498号公報に記載の細胞伸

展活性を示すポリペプチド、例えば、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン、ビトロネクチン、オステオポンチン、トロンボスポンジン、テネイシン等の細胞外マトリックスの構成成分等がある。細胞外マトリックス構成成分は公知の方法〔インターナショナル ジャーナル オブ キャンサー(International Journal of Cancer)、第20巻、第1～5頁(1977)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、第254巻、第9933～9937頁(1979)、日本生化学会編：“統生化学実験講座 第6巻 細胞骨格の構造と機能(下)”、(第1版)(1986)東京化学同人発行、セル ストラクチャー アンド ファンクション (Cell Structure and Function)、第13巻、第281～292頁(1988)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第264巻、第18202～18208頁(1989)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第260巻、第12240～12245頁(1985)〕で、天然物、培養物より調製することができる。細胞接着活性ポリペプチドとしては、実質的に純化された細胞接着活性を示す細胞外マトリックス、実質的に純化された細胞外マトリックスフラグメントまたはそれらの混合物でも良く、細胞接着活性、細胞伸展活性を有するタンパク質、ポリペプチドおよびその機能的同等物を使用することができる。

これらの細胞接着活性ポリペプチドは、実質的に純化された天然物を使用しても良く、その酵素学的、化学的分解物、またこれらの物質を遺伝子工学的に作成したものを使用しても良い。さらに、これらの物質の機能、すなわち細胞接着活性、細胞伸展活性を損なうことなく改変した物も使用することができる。なお本発明において、天然起源のポリペプチドのアミノ酸配列のアミノ酸が欠失、置換、付加および/または挿入のいずれか一

つながられていても所望の細胞接 活性、細胞伸展活性を有するポリペプチドを天然アミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的同等物という。すなわち、天然に存在するタンパク質にはそれをコードする遺伝子の多形や変異によりアミノ酸配列に変化が生じたものの他に、生成後のタンパク質の生体内および精製中の修飾反応などによって、そのアミノ酸配列中にアミノ酸の欠失、挿入、付加、置換等の変異が起こったものも含まれるが、それにも関わらず変異を有しないタンパク質と実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に差異があっても、その主要な機能を共通にしていると認められるものを機能的に同等の活性を有するポリペプチドと呼ぶ。

人為的にタンパク質のアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合でも同様であり、この場合はさらに多種多様の変異体を作製することが可能であるが、変異を有しないものと実質的に同等の生理活性を示す限り、これらの変異体は機能的に同等の活性を有するポリペプチドと解釈される。

たとえば、大腸菌で発現されたタンパク質のN末端に存在するメチオニン残基は、多くの場合、メチオニンアミノペプチダーゼの作用により除去されるとされているが、タンパク質の種類によってはメチオニン残基を持つもの、持たないものの両方が生成される。しかしながら、このメチオニン残基の有無はタンパク質の活性に影響を与えない場合が多い。また、ヒトインターロイキン2 (IL-2) のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン2活性を保持することが知られている [サイエンス (Science)、第224巻、1431頁 (1984)]。

さらに、遺伝子工学的にタンパク質の生産を行う際には、融合タンパク質として発現させることがしばしば行われる。たとえば、目的のタンパク

質の発現量を増加させるために、目的のタンパク質のN末端に他のタンパク質由来のN末端ペプチド鎖を付加したり、目的のタンパク質のN末端、あるいはC末端に適当なペプチド鎖を付加して発現させ、この付加したペプチド鎖に親和性を持つ担体を使用することにより、目的のタンパク質の精製を容易にすることなどが行われている。

この点に関して、関連バイオテクノロジー技術は、対象の機能的領域中のアミノ酸の欠失、置換、付加または他の修飾を定型的に実施することができる状態にまで進歩している。次に、得られたアミノ酸配列は所望の細胞接着活性または細胞伸展活性について、上記の方法により定型的にスクリーニングすることができる。

細胞接着活性を有するポリペプチドは、分子内に細胞接着活性に必要なアミノ酸配列、例えば、配列表の配列番号1 (RGDS) で表されるアミノ酸配列、配列表の配列番号2 (CS1) で表されるアミノ酸配列、配列表の配列番号6 (ラミニンの中心配列、YIGSR) で表されるアミノ酸配列より選択されるアミノ酸配列を含有する人工のポリペプチドでも良く、これらのポリペプチドは遺伝子工学的な方法、化学合成方法で大量に調製でき、純化されたポリペプチドとして使用することができる。

分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平1-180900号公報に記載の配列表の配列番号7で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドは、*Escherichia coli* HB101/pTF1409 (FERM BP-1939) を用いて該公報に記載の方法により調製することができる。また、下記表1に示す各配列表の配列番号で表されるポリペプチドも、各公報記載の遺伝子工学的な方法により調製することができる。

なお、表1中の *Escherichia coli* HB101/pCHV90 が含有す

るプラスミド HB101/pCHV90は、Escherichia coli HB101/pHD101 (FERM BP-2264) および Escherichia coli JM109/pTF7021 (FERM BP-1941) を用い、特開平5-271291号公報記載の方法により調製することができる。

表1

公開公報	配列表の 配列番号	生産菌 (Escherichia coli)	寄託番号
特開平1-206998号	配列番号 8	JM109/pTF7021	FERM BP-1941
特開平1-261398号	配列番号 9	HB101/pTF1801	FERM P-9948
特開平2-97397号	配列番号 3	JM109/pTF7221	FERM BP-1915
特開平2-152990号	配列番号 10	JM109/pTFB800	FERM BP-2126
特開平2-311498号	配列番号 11	HB101/pCH101	FERM BP-2799
特開平3-59000号	配列番号 12	JM109/pCF406	FERM P-10837
特開平3-232898号	配列番号 13	HB101/pCE102	FERM P-11226
特開平4-54199号	配列番号 14	JM109/pTF7520 +VN-IN. TAA	FERM P-11526
	配列番号 15	JM109/pTF7520 +Col ^{xi}	FERM P-11527
特開平5-271291号	配列番号 16	HB101/pCHV179	FERM P-12183
	配列番号 17	HB101/pCHV90	—
	配列番号 18	HB101/pCHV89	FERM P-12182
特開平5- 97698号	配列番号 19	JM109/pTF7520ColV	FERM BP-5277
特開平5-178897号	配列番号 20	JM109/pYMH-CF・A	FERM BP-5278

また、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドは化学合成することもでき、例えば、特開平3-173828号公報に記載のポリRGDSを合成、使用しても良い。

分子内に配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平2-311498号公報に記載の配列表の配列番号4で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドは *Escherichia coli* HB101/pHD102 (FERM P-10721) を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製することができる。また、特開平3-284700号公報に記載の方法に従い、配列表の配列番号2で表されるポリペプチドを化学合成しても良い。

さらに、分子内に配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列および配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列を含有する人工のポリペプチドとしては、例えば、特開平2-311498号公報に記載の配列表の配列番号21で表されるポリペプチドがあり、該ポリペプチドは *Escherichia coli* HB101/pCH102 (FERM BP-2800) を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製することができる。また、特開平3-284700号公報に記載の配列表の配列番号5で表されるポリペプチドも分子内に配列表の配列番号1、2のアミノ酸配列を含有するポリペプチドであり、該ポリペプチドは *Escherichia coli* HB101/pCS25 (FERM P-11339) を用いて公報に記載の方法により遺伝子工学的に調製できる。

以上のように、本発明に使用するポリペプチドの例としては、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有する細胞接着活性ポリペプチドがあり、該ポリペプチドとしては、例えば、ヒト・フィブロネクチンの細胞接

ドメイン【モッシャー, D. F. (Mosher, D. F.) 編: “フィブロネクチン” (Fibronectin)、第47~121頁(1989)アカデミックプレス (Academic Press) 発行] 由来ポリペプチドと同CS1ポリペプチド(同上刊行物)が共有結合したもの、CS1ポリペプチドを含有するヘパリン結合ドメイン(同上刊行物)由来ポリペプチド、あるいは細胞接着由来ポリペプチドを使用することができ、これらはそれぞれ遺伝子工学的に作製することができる。例えば、細胞接着ドメイン由来ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、CS1ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、CS1ポリペプチドを含有するヘパリン結合ドメイン由来ペプチドをコードするDNAを含むベクターから、それぞれ必要な領域を取出し、単独あるいは組合せて使用することにより、分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

分子内に配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと分子内に配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドが共有結合したポリペプチドを作製する場合、ポリペプチド間の共有結合は、直接結合であってもよく、間接結合、例えば、スパーサーを介した間接結合であってもよい。スパーサーは、各領域の分子間距離を調節するための挿入配列であり、任意のペプチド鎖を用いることができ、例えば、フィブロネクチン分子中のCS1領域の上流配列であってもよい。スパーサー配列は遺伝子工学的に容易に導入することができる。

細胞接着合成ポリマーとしては、例えば、公知のポリ-N-p-ビニルベンジル-D-ラクトンアミド(PVLA)が挙げられる。

本発明において、標的細胞は特に限定するものではないが、例えば、造

血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血細胞、ES細胞、リンパ球、癌細胞等が挙げられる。

外来遺伝子も、特に限定するものではなく、例えば、タンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞内抗体をコードする核酸、偽（デコイ）遺伝子から選択される核酸が挙げられ、本発明においては、外来遺伝子はベクターに組み込まれていてもよい。

ベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター等が挙げられる。

本発明によれば、常法に従って穿孔法によって外来遺伝子を導入した標的細胞を、細胞接着活性物質の存在下で培養することにより、該遺伝子が導入された形質転換細胞を効率よく得ることができる。細胞培養方法としては使用する細胞により、公知の方法から選択すれば良い。例えば細胞接着活性ポリペプチドの存在下で細胞培養を行う場合、培養液中に250～2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の細胞接着活性ポリペプチドを含有させ、常法に従い培養すれば良い。

特に、細胞接着活性物質を被覆した培養器具を用いて培養するのが好ましい。培養器具とは、通常に細胞を培養する目的に使用する器具であれば良く、例えば、培養皿、マイクロキャリアー使用の培養器具、繊維状の中空糸使用の培養器具である。培養器具への該物質の被覆方法としては塗布しても良く、散布しても良い。例えば、細胞接着活性ポリペプチドの培養器具への被覆は容易に行うことができ、該ポリペプチドを例えばリン酸緩衝生理食塩水（PBS）のような適当な溶液に溶かし、培養器具に添加し、適当時間静置することで培養器具にポリペプチドを被覆できる。培養器具

に被覆するポリペプチド量としては50～1000 pmol/cm²の範囲、好適には150～600 pmolの範囲より選択すれば良い。

細胞接着活性物質の存在下で培養した形質転換細胞は培養物中より常法により得ることができ、形質転換細胞を効率よく製造することができる。

得られた形質転換細胞は、細胞の遺伝子組換え技術を用いる有用物質の生産、疾患モデルの開発、遺伝子治療等に有用であり、本発明により、効率よく形質転換細胞が提供される。

また、細胞接着活性物質を含有するキットを使用することにより、本発明を簡便に行うことができる。キット中に含有される細胞接着活性物質は溶液でも良く、凍結乾燥品でも良い。キット中には細胞接着活性物質の溶解、希釈用緩衝液、細胞培養培地、細胞培養器具等を含有させても良い。例えば本発明の方法に用いるポリペプチド類、ポリペプチド希釈用PBS、培養器具等をまとめてキットとしておくことにより、簡便に、形質転換細胞の製造を行うことができる。キットに含める試薬は、溶液状でも凍結乾燥物でもよい。

なお、本発明で使用する穿孔法としての、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等は、目的に応じて適宜選択、使用できる。

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1

1. 細胞接着活性ポリペプチドの培養皿への塗布

配列表の配列番号3で表されるポリペプチド（以下C274と称す）、配列表の配列番号4で表されるポリペプチド（以下H296と称す）および配列表の配列番号5で表されるポリペプチド（以下C・CS1と称す）

をそれぞれ1 μ Mとなるようにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶かし、0.22 μ mのフィルター (マイレクス-GV、ミリポア社) を用いて滅菌した。

これらの溶液をそれぞれ24穴のポリスチレン製培養皿 (コーニング社製) に1ml/ウェルとなるように添加し、4℃、一晚コートした。この培養皿は、以下に記載の形質転換細胞を添加する前に、ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地500 μ l/ウェルでリンスした。

2. 細胞の形質転換

10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地で培養したヒト類表皮癌A-431細胞の培養皿 (直径100mm) 2枚分をそれぞれ10mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地でリンスした後、0.25%ウシ・トリプシンと0.02%EDTAを含むPBSを3ml添加して細胞を培養皿よりはがした。これらに、それぞれ7mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地を加えた後、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地に懸濁し800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を合せて、10mlのPBSに懸濁し、その10分の3量を取り、二分した後、それぞれを800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を再度、10mlのPBSに懸濁し、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞の一方は、無菌的に調製されたpCAT-コントロール (control) ベクター (プロメガ社) 15 μ gを含む1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー (バイオラッド社) 用のエレクトロポレーションキューベットに入れ、水中で10分放置した。もう一方の細胞は、1mlのPBSに懸濁した後、ジーンパルサー (バイオラッド社) 用のエレクトロポレーションキューベットに入れ、水中

で10分放置した。それぞれの細胞は、水中10分放置後、250V、960 μ Fで電圧を印加した。印加後、細胞をキュベットのまま水中で10分放置した。この後、15mlの10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地中へ細胞を回収し、上記のポリペプチドをコートした24穴のポリスチレン製培養皿に1ml/ウェルとなるように添加した。これらの細胞を5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した後、培地をアスピレーションで除去し、新たに10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地を1ml/ウェルとなるように加え、5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。

3. 形質転換効率（遺伝子導入効率）の測定

培養した細胞は、1ウェル当たり1.25mlのPBSで3回リンスし、CAT-ELISAキット（ベーリンガー・マンハイム社製）を用い、本キットの使用方法に従い、細胞溶解液を調製し発現CATの検出を行った。本キットは、西洋ワサビのペルオキシダーゼ標識の2次抗体と基質としてABTSを用いているので405nm/490nmを測定し、エレクトロポレーションの際、pCAT-コントロールベクターを添加しなかったものをブランクとして用い、各区のpCAT-コントロールベクターを添加したものの値からブランク値を引いた値を発現CAT量とした。

この結果を図1に示す。すなわち、図1は各ポリペプチド処理区での細胞への遺伝子導入効率を示す図であり、縦軸に無処理区、各ポリペプチド処理区が示され、横軸は405nmの吸光度と490nmの吸光度比で遺伝子導入効率が示されている。

図1に示すように、上記C274、H296、C・CS1処理区では無処理の培養皿に比べて発現CAT量は高く、pCAT-コントロールベクターの細胞への導入効率が高いことが示された。

実施例 2

1. 細胞接 活性ポリペプチドの培養皿への塗布

配列表の配列番号3で表されるポリペプチド（以下C274と称す）、配列表の配列番号4で表されるポリペプチド（以下H296と称す）および配列表の配列番号5で表されるポリペプチド（以下C・CS1と称す）をそれぞれ1 μ Mとなるようにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶かし、0.22 μ mのフィルター（マイレクス-GV、ミリポア社）を用いて滅菌した。これらの溶液をそれぞれ24穴のポリスチレン製培養皿（コーニング社製）に1ml/ウェルとなるように添加し、4℃、一晚コートした。この培養皿は、以下に記載の形質転換細胞を添加する前に、ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地500 μ l/ウェルでリンスした。

2. 細胞の形質転換

10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地で培養したアフリカミドリザル腎COS-7細胞の培養皿（直径100mm）2枚分をそれぞれ10mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地でリンスした後、0.25%ウシ・トリプシンと0.02%EDTAを含むPBSを3ml添加して細胞を培養皿よりはがした。これらに、それぞれ7mlのウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変最少基本培地を加えた後、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を10mlのウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地に懸濁し800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を合せて、12mlのPBSに懸濁し、その6分の5量を取り、二分した後、それぞれを800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞を、6mlのPBSに懸濁し、800rpm、3分遠心して細胞を集めた。得られた細胞の一方は、無菌的に調製されたpCAT-コントロール（control）ベクター（プロメガ社）

15 μ gを含む1mlのPBSに懸濁した後、ジーンバルサー（バイオラッド社）用のエレクトロポレーションキューベットに入れ、水中で10分放置した。もう一方の細胞は、1mlのPBSに懸濁した後、ジーンバルサー（バイオラッド社）用のエレクトロポレーションキューベットに入れ、水中で10分放置した。それぞれの細胞は、水中10分放置後、250V、960 μ Fで電圧を印加した。印加後、細胞をキューベットのまま水中で10分放置した。この後、15mlの10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地中へ細胞を回収し、上記のポリペプチドをコートした24穴のポリスチレン製培養皿に1ml/ウェルとなるように添加した。これらの細胞を5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した後、培地をアスピレーションで除去し、新たに10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変最少基本培地を1ml/ウェルとなるように加え、5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。

3. 形質転換効率（遺伝子導入効率）の測定

培養した細胞は、1ウェル当たり1.25mlのPBSで3回リンスし、CAT-ELISAキット（ベーリンガー・マンハイム社製）を用い、本キットの使用方法に従い、細胞溶解液を調製し発現CATの検出を行った。本キットは、西洋ワサビのペルオキシダーゼ標識の2次抗体と基質としてABTSを用いているので405nm/490nmを測定し、エレクトロポレーションの際、pCAT-コントロールベクターを添加しなかったものをブランクとして用い、各区のpCAT-コントロールベクターを添加したものの値からブランク値を引いた値を発現CAT量とした。この結果を図2に示す。すなわち、図2は各ポリペプチド処理区での細胞への遺伝子導入効率を示す図であり、縦軸に無処理区、各ポリペプチド処理区が示され、横軸は405nmの吸光度と490nmの吸光度比で遺伝子導入効

率が示されている。

図2に示すように、上記C274、H296、C・CS1処理区では無処理の培養皿に比べて発現CAT量は高く、pCAT-コントロールベクターの細胞への導入効率が高いことが示された。

実施例3

キットの作製

下記表2に示すようにC274、H296、C・CS1、PBSおよび培養皿で遺伝子導入細胞製造用キットを作製した。このうち、試薬A、B、Cはそれぞれ上記のポリペプチドをPBSにて表に示す濃度としたものを調製した。その他は、実施例1に記載のものを使用した。なお、表2に示すキットの試薬A、B、Cおよび試薬希釈液は、いずれも0.22 μ mの滅菌フィルターで予めろ過したものを用いて、無菌的に調製した。

表2

形質転換細胞製造用キット

試薬A・・・100 μ M C274	150 μ l
試薬B・・・100 μ M H296	150 μ l
試薬C・・・100 μ M C・CS1	150 μ l
試薬希釈液・・・PBS	45ml
24穴ポリスチレン製培養皿	3枚

以上記載したごとく、本発明によれば、細胞への遺伝子導入を目的とする従来法の問題点を解決し、標的細胞への外来遺伝子導入効率を向上させた形質転換細胞製造方法が提供できる。また、該方法に使用する形質転換細胞製造用のキットも提供することができる。

図面の簡単な説明

図1は、ヒト類表皮癌A-431細胞へのpCAT-コントロールベクターの導入における細胞接着活性ポリペプチド処理の遺伝子導入効率に対する効果を示すグラフである。

図2は、アフリカミドリザル腎COS-7細胞へのpCAT-コントロールベクターの導入における細胞接着活性ポリペプチド処理の遺伝子導入効率に対する効果を示すグラフである。

配列 号 : 1

配列の長さ : 4

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Arg Gly Asp Ser

1

配列番号 : 2

配列の長さ : 25

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His

1

5

10

15

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

20

25

配列番号 : 3

配列の長さ : 274

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165

Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			
	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe			
	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			
	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg			
	245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg			
	260	265	270
Thr Glu Ile Asp			

配列番号 : 4

配列の長さ : 296

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro			
	5	10	15

Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr	20	25	30
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met	35	40	45
Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser	50	55	60
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu	65	70	75
Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr	80	85	90
Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala	95	100	105
Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr	110	115	120
Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr	125	130	135
Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile	140	145	150
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr	155	160	165
Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser	170	175	180
Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr	185	190	195

Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile			
	200	205	210
Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg			
	215	220	225
Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile			
	230	235	240
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala			
	245	250	255
Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys			
	260	265	270
Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu			
	275	280	285
His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr			
	290	295	

配列番号 : 5

配列の長さ : 302

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1

5

10

15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
	20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp			
	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe			
	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg			
	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp			
	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr			
	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg			
	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195

Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
	200	205
		210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
	215	220
		225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
	230	235
		240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
	245	250
		255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
	260	265
		270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr		
	275	280
		285
Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro		
	290	295
		300
Ser Thr		

配列番号 : 6

配列の長さ : 5

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Tyr Ile Gly Ser Arg

1

5

配列番号 : 7

配列の長さ : 283

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro			
1	5	10	15
Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu			
	20	25	30
Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp			
	35	40	45
Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu			
	50	55	60
Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser			
	65	70	75
Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys			
	80	85	90
Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr			
	95	100	105
Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile			
	110	115	120
Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg			
	125	130	135

Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu			
	140	145	150
Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala			
	155	160	165
Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser			
	170	175	180
Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr			
	185	190	195
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val			
	200	205	210
Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro			
	215	220	225
Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile			
	230	235	240
Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala			
	245	250	255
Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser			
	260	265	270
Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met			
	275	280	

配列番号 : 8

配列の長さ : 279

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165

- 28 -

Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro			
1	5	10	15
Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu			
	20	25	30
Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp			
	35	40	45
Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu			
	50	55	60
Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser			
	65	70	75
Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys			
	80	85	90
Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr			
	95	100	105
Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile			
	110	115	120
Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg			
	125	130	135
Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu			
	140	145	150
Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala			
	155	160	165
Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser			
	170	175	180

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr			
	185	190	195
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val			
	200	205	210
Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro			
	215	220	225
Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile			
	230	235	240
Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala			
	245	250	255
Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser			
	260	265	270
Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Asn Glu Gly			
	275	280	285
Leu Asn Gln Pro Thr Asp Asp Ser Cys Phe Asp Pro Tyr Thr Val			
	290	295	300
Ser His Tyr Ala Val Gly Asp Glu Trp Glu Arg Met Ser Glu Ser			
	305	310	315
Gly Phe Lys Leu Leu Cys Gln Cys Leu Gly Phe Gly Ser Gly His			
	320	325	330
Phe Arg Cys Asp Ser Ser Arg Trp Cys His Asp Asn Gly Val Asn			
	335	340	345
Tyr Lys Ile Gly Glu Lys Trp Asp Arg Gln Gly Glu Asn Gly Gln			
	350	355	360

Met Met Ser Cys Thr Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly Glu Phe Lys		
	365	370
Cys Asp Pro His Glu Ala Thr Cys Tyr Asp Asp Gly Lys Thr Tyr		375
	380	385
His Val Gly Glu Gln Trp Gln Lys Glu Tyr Leu Gly Ala Ile Cys		390
	395	400
Ser Cys Thr Cys Phe Gly Gly Gln Arg Gly Trp Arg Cys Asp Asn		405
	410	415
Cys Arg Arg Pro Gly Gly Glu Pro Ser Pro Glu Gly Thr Thr Gly		420
	425	430
Gln Ser Tyr Asn Gln Tyr Ser Gln Arg Tyr His Gln Arg Thr Asn		435
	440	445
Thr Asn Val Asn Cys Pro Ile Glu Cys Phe Met Pro Leu Asp Val		450
	455	460
Gln Ala Asp Arg Glu Asp Ser Arg Glu		465
	470	

配列番号 : 10

配列の長さ : 385

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ala Pro Ile Val Asn Lys Val Val Thr Pro Leu Ser Pro Pro Thr			
1	5	10	15
Asn Leu His Leu Glu Ala Asn Pro Asp Thr Gly Val Leu Thr Val			
	20	25	30
Ser Trp Glu Arg Ser Thr Thr Pro Asp Ile Thr Gly Tyr Arg Ile			
	35	40	45
Thr Thr Thr Pro Thr Asn Gly Gln Gln Gly Asn Ser Leu Glu Glu			
	50	55	60
Val Val His Ala Asp Gln Ser Ser Cys Thr Phe Asp Asn Leu Ser			
	65	70	75
Pro Gly Leu Glu Tyr Asn Val Ser Val Tyr Thr Val Lys Asp Asp			
	80	85	90
Lys Glu Ser Val Pro Ile Ser Asp Thr Ile Ile Pro Ala Val Pro			
	95	100	105
Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met			
	110	115	120
Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe			
	125	130	135
Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu			
	140	145	150
Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu			
	155	160	165
Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu			
	170	175	180

Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu	185	190	195
Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser	200	205	210
Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr	215	220	225
Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu	230	235	240
Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu	245	250	255
Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly	260	265	270
Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser	275	280	285
Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser	290	295	300
Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr	305	310	315
Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu	320	325	330
Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu	335	340	345
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly	350	355	360

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
 365 370 375
 Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met
 380 385

配列番号 : 11

配列の長さ : 549

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 80 85 90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg	245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg	260	265	270

Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp	275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp	290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr	305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro	320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys	335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg	350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro	365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile	380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp	395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys	410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr	425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser	440	445	450

Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser			
	455	460	465
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser			
	470	475	480
Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr			
	485	490	495
Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg			
	500	505	510
Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr			
	515	520	525
Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser			
	530	535	540
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr			
	545		

配列番号 : 12

配列の長さ : 422

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1

5

10

15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu	20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu	185	190	195

Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			
	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe			
	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			
	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg			
	245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg			
	260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Asn Glu Gly Leu Asn Gln			
	275	280	285
Pro Thr Asp Asp Ser Cys Phe Asp Pro Tyr Thr Val Ser His Tyr			
	290	295	300
Ala Val Gly Asp Glu Trp Glu Arg Met Ser Glu Ser Gly Phe Lys			
	305	310	315
Leu Leu Cys Gln Cys Leu Gly Phe Gly Ser Gly His Phe Arg Cys			
	320	325	330
Asp Ser Ser Arg Trp Cys His Asp Asn Gly Val Asn Tyr Lys Ile			
	335	340	345
Gly Glu Lys Trp Asp Arg Gln Gly Glu Asn Gly Gln Met Met Ser			
	350	355	360
Cys Thr Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly Glu Phe Lys Cys Asp Pro			
	365	370	375

His Glu Ala Thr Cys Tyr Asp Asp Gly Lys Thr Tyr His Val Gly			
	380	385	390
Glu Gln Trp Gln Lys Glu Tyr Leu Gly Ala Ile Cys Ser Cys Thr			
	395	400	405
Cys Phe Gly Gly Gln Arg Gly Trp Arg Cys Asp Asn Cys Arg Arg			
	410	415	420
Pro Gly			

配列番号 : 13

配列の長さ : 332

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg			
1	5	10	15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
	20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg	245	250	255

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg			
	260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Asn Ser Asp Ser Glu Cys			
	275	280	285
Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His Asp Gly Val Cys Met			
	290	295	300
Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn Cys Val Val Gly			
	305	310	315
Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys Trp Trp Glu			
	320	325	330
Leu Arg			

配列番号 : 14

配列の長さ : 341

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg			
1	5	10	15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
	20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
	35	40	45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp			
	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe			
	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg			
	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp			
	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr			
	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg			
	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			
	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe			
	215	220	225

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
	230	235 240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
	245	250 255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
	260	265 270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Gly Ile Tyr Ile Ser Gly Met		
	275	280 285
Ala Pro Arg Pro Ser Leu Thr Lys Lys Gln Arg Phe Arg His Arg		
	290	295 300
Asn Arg Lys Gly Tyr Arg Ser Gln Arg Gly His Ser Arg Gly Arg		
	305	310 315
Asn Gln Asn Ser Arg Arg Pro Ser Arg Ala Met Trp Leu Ser Leu		
	320	325 330
Phe Ser Ser Lys Asn Ser Ser Ser Val Pro Ala		
	335	340

配列番号 : 15

配列の長さ : 446

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg			
1	5	10	15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
	20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp			
	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe			
	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg			
	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp			
	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr			
	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg			
	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180

Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg	245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg	260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Val Pro Gly Phe Lys Gly Asp	275	280	285
Met Gly Leu Lys Gly Asp Arg Gly Glu Val Gly Gln Ile Gly Pro	290	295	300
Arg Gly Xxx Asp Gly Pro Glu Gly Pro Lys Gly Arg Ala Gly Pro	305	310	315
Thr Gly Asp Pro Gly Pro Ser Gly Gln Ala Gly Glu Lys Gly Lys	320	325	330
Leu Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Tyr Pro Gly Arg Gln Gly Pro	335	340	345
Lys Gly Ser Thr Gly Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ala Asn Gly Glu	350	355	350

Lys Gly Ala Arg Gly Val Ala Gly Lys Pro Gly Pro Arg Gly Gln		
	365	370 375
Arg Gly Pro Thr Gly Pro Arg Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Pro		
	380	385 390
Thr Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Thr Ser Gly Gly Asp Gly Pro		
	395	400 405
Pro Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Pro Gln Gly Pro Gln Gly Pro		
	410	415 420
Val Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Arg		
	425	430 435
Met Gly Cys Pro Gly His Pro Gly Gln Arg Gly		
	440	445

配列番号 : 16

配列の長さ : 457

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg		
1	5	10 15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu		
	20	25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg	200	205	210

Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg	245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg	260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg	275	280	285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp	290	295	300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val	305	310	315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp	320	325	330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr	335	340	345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro	350	355	360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu	365	370	375
Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln	380	385	390

- 50 -

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe	215	220	225

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn		
275	280	285
Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp		
290	295	300
Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu		
305	310	315
Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro		
320	325	330
Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu		
335	340	345
Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu		
350	355	360
Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr		
365		

配列番号 : 18

配列の長さ : 367

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165

Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			
	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe			
	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			
	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg			
	245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg			
	260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg			
	275	280	285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp			
	290	295	300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val			
	305	310	315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp			
	320	325	330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr			
	335	340	345

Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro

350

355

360

Val Val Ile Asp Ala Ser Thr

365

配列番号 : 19

配列の長さ : 464

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1

5

10

15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20

25

30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35

40

45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50

55

60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65

70

75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

80

85

90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg	245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg	260	265	270

Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Gly Ile Arg Gly Leu Lys Gly			
	275	280	285
Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Asp Gly Phe Pro Gly Phe Lys Gly			
	290	295	300
Asp Met Gly Ile Lys Gly Asp Arg Gly Glu Ile Gly Pro Pro Gly			
	305	310	315
Pro Arg Gly Glu Asp Gly Pro Glu Gly Pro Lys Gly Arg Gly Gly			
	320	325	330
Pro Asn Gly Asp Pro Gly Pro Leu Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly			
	335	340	345
Lys Leu Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Tyr Pro Gly Arg Gln Gly			
	350	355	360
Pro Lys Gly Ser Ile Gly Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ala Asn Gly			
	365	370	375
Glu Lys Gly Gly Arg Gly Thr Pro Gly Lys Pro Gly Pro Arg Gly			
	380	385	390
Gln Arg Gly Pro Thr Gly Pro Arg Gly Glu Arg Gly Pro Arg Gly			
	395	400	405
Ile Thr Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Asn Ser Gly Gly Asp Gly			
	410	415	420
Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Pro Asn Gly Pro Gln Gly			
	425	430	435
Pro Thr Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly			
	440	445	450

Lys Asp Gly Leu Pro Gly His Pro Gly Gln Arg Gly Glu Thr

455

460

配列番号 : 20

配列の長さ : 432

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg			
1	5	10	15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
	20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp			
	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe			
	95	100	105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg			
	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp			
	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr			
	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg			
	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			
	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe			
	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			
	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg			
	245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg			
	260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr			
	275	280	285

Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro			
	290	295	300
Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly			
	305	310	315
Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg			
	320	325	330
Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu			
	335	340	345
Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu			
	350	355	360
Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr			
	365	370	375
Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn			
	380	385	390
Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys			
	395	400	405
Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln			
	410	415	420
Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser			
	425	430	

配列番号 : 21

配列の長さ : 574

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1					5				10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165

Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			
	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe			
	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			
	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg			
	245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg			
	260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp			
	275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp			
	290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr			
	305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro			
	320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys			
	335	340	345

Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg	350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro	365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile	380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp	395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys	410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr	425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser	440	445	450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser	455	460	465
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser	470	475	480
Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr	485	490	495
Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg	500	505	510
Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr	515	520	525

Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser			
	530	535	540
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu			
	545	550	555
Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp			
	560	565	570
Val Pro Ser Thr			

請 求 の 範 囲

1. 穿孔法を用いて外来遺伝子を標的細胞に導入し形質転換細胞を製造する方法において、穿孔法を用いて標的細胞内に外来遺伝子の注入操作を行った後、該細胞を細胞接着活性物質の存在下で培養する工程を包含することを特徴とする外来遺伝子による形質転換細胞の製造方法。

2. 培養工程が、細胞接着活性物質を被覆した培養器具を用いて培養する工程である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。

3. 細胞接着活性物質が、細胞接着活性ポリペプチドまたは該ポリペプチドの機能的同等物である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。

4. 細胞接着活性ポリペプチドが、細胞接着伸展活性ポリペプチドである請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。

5. 細胞接着伸展活性ポリペプチドが、配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列および/または配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドである請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。

6. 細胞接着活性ポリペプチドが、配列表の配列番号3、4および5で表されるポリペプチドから選択される請求項3記載の形質転換細胞の製造方法。

7. 細胞接着性物質がポリ-N- α -ベンジル-D-ラクトンアミドである請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。

8. 標的細胞が造血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血細胞、ES細胞、リンパ球、癌細胞から選択される細胞である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。

9. 外来遺伝子がタンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞

内抗体をコードする核酸、偽（デコイ）遺伝子から選択される核酸である請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。

10. 外来遺伝子がタンパク質をコードする核酸、ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞内抗体をコードする核酸、偽（デコイ）遺伝子から選択される核酸であり、該核酸がベクターに組み込まれている請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。

11. ベクターがレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターから選択されるベクターである請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。

12. 穿孔法がエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法およびパーティクルガン法から選択される請求項1記載の形質転換細胞の製造方法。

13. 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法によって製造される外来遺伝子による形質転換細胞。

14. 請求項1記載の形質転換細胞の製造方法に使用するキットであって、細胞接着活性物質を含有することを特徴とする外来遺伝子による形質転換細胞の製造用キット。

図 1

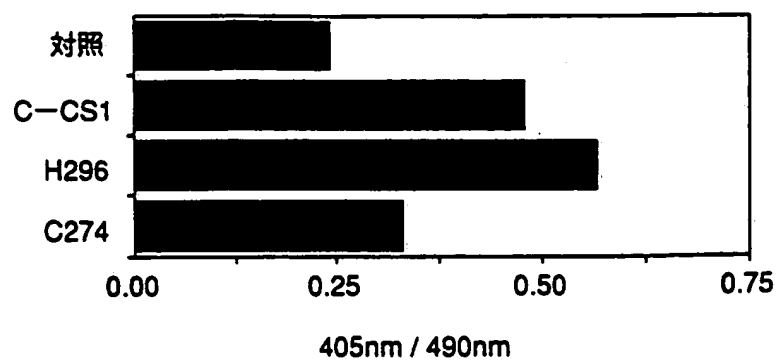
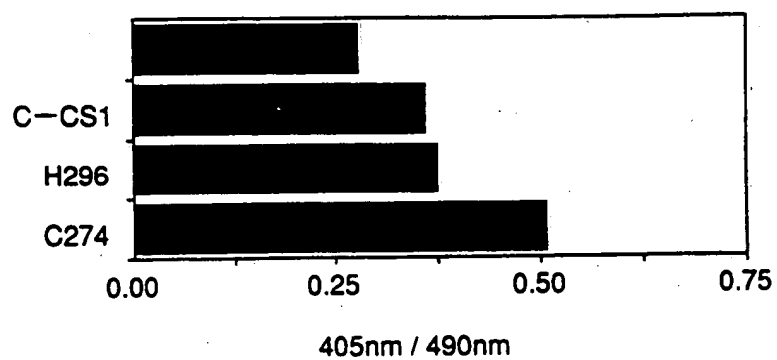


図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02425

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTERInt. Cl⁶ C12N15/87, C12N5/10, C07K14/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/87, C12N5/10, C07K14/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS
CAS ONLINE**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 4-063597, A (W.R. Grace & Co.), February 28, 1992 (28. 02. 92) & EP, 463508, A & CA, 2044307, A	1 - 14
A	JP, 6-090771, A (Shiseido Co., Ltd.), April 5, 1994 (05. 04. 94) (Family: none)	1 - 14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

March 1, 1996 (01. 03. 96)

Date of mailing of the international search report

March 19, 1996 (19. 03. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際 許分類 (IPC))		
Int. C ² C12N15/87, C12N5/10, C07K14/78		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. C ² C12N15/87, C12N5/10, C07K14/78		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS CAS ON LINE		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 4-063597, A (ダブリュー・アール・グレース・ アンド・カンパニー コーン), 28. 2月. 1992 (28. 02. 92) & EP, 463508, A&CA, 2044307, A	1-14
A	JP, 6-090771, A (株式会社 資生堂), 5. 4月. 1994 (05. 04. 94) (ファミリーなし)	1-14
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 01. 03. 96		国際調査報告の発送日 19.03.96
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高 堀 栄 二 電話番号 03-3581-1101 内線 3449